

丹参总酚酸提取工艺的优化*

王小平^{1,2}, 刘峰², 韩翠², 张勤²

(1. 陕西中医学院, 陕西咸阳 712046; 2. 咸阳步长制药有限公司, 陕西咸阳 712000)

[摘要] 目的: 优化丹参总酚酸的提取工艺。方法: 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验设计, 以总酚酸和丹酚酸B的含量为指标, 优选丹参总酚酸的最佳工艺条件。结果: 丹参饮片中丹参总酚酸的最佳提取工艺为: 6倍量20%乙醇回流提取3次, 0.5h/次。结论: 该提取工艺设计合理, 简单易行。

[关键词] 正交设计; 丹参; 总酚酸; 丹酚酸B; 提取工艺

中图分类号: R284.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2010)02-0032-02

丹红注射液(国药准字Z20026866)是步长集团独家拥有自主知识产权的主导品种之一, 具有活血化瘀、通脉舒络功能, 用于瘀血闭阻所致的胸痹及中风、冠心病、心绞痛, 心肌梗死等症。2005年获得国家发明专利(专利号ZL02153312.1)。2006年入选“第三届百姓放心药品”十大中药注射液之一。丹参是丹红注射液的主要药味之一, 本研究以总酚酸和丹酚酸B的含量为考察指标, 采用正交设计优化丹参总酚酸的提取工艺, 旨在为丹参总酚酸的提取提供参考, 为丹红注射液的二次开发奠定基础。

1 仪器、试剂与材料

1.1 仪器与材料

戴安 UitiMate 3000 全自动高效液相色谱仪, 泵: UitiMate 3000; 自动进样器: UitiMate 3000; 检测器: UitiMate 3000 UV 检测器。工作站: Chromeleon。UV756 紫外可见分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。Discovery DV215CD 型双量程电子分析天平(瑞士; 0.01mg; 0.1mg)

1.2 试剂

流动相所用甲醇为色谱醇, 其他试剂如: 乙醇等均为分析纯; 丹参来自山东丹参 GAP 基地; 丹酚酸 B (111562-200807) 由中国药品生物制品检定所提供。

2 方法与结果

2.1 正交试验设计

选择用量、提取时间及次数为观察因素, 以总酚酸和丹酚酸 B 的含量为观察指标, 应用 $L_9(3^4)$ 正交设计表进行正交试验, 因素水平见表 1。

表 1 因素水平表

水平	乙醇用量 (B) /倍	提取时间 (C) /h	提取次数 (D)
1	6	0.5	1
2	7	1	2
3	8	1.5	3

2.2 提取工艺

准确称取丹参饮片 9 份(每份平行 2 个), 每份为 30g, 按 $L_9(3^4)$ 正交试验表(表 1)所示条件提取, 滤过, 滤液合并, 精密吸取适量, 置 10 mL 量瓶中, 加相应溶媒至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.3 丹酚酸 B 的含量测定^[1]

精密 2.1 项下的溶液 2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加相应的溶媒至刻度, 摇匀, 精密吸取 10 μ L, 注入液相色谱仪, 记录峰面积。

2.4 总酚酸的含量测定^[2,4]

精密吸取 2.1 项下的溶液 0.2 mL, 置 10 mL 量瓶中, 依次加入 5% 的亚硝酸钠 0.5 mL, 10% 硝酸铝 0.5 mL, 4% 的氢氧化钠 5 mL, 加水稀释至刻度, 摇匀。在 500 nm 处, 测定吸光度。以丹酚酸 B 计, 按线性回归方程计算。

* 收稿日期: 2009-10-26

作者简介: 王小平(1976~), 女, 陕西宝鸡人, 主管中药师, 讲师, 博士, 从事中草药化学成分分析及新药研究。

2.5 正交试验结果分析

2.5.1 丹酚酸 B 正交试验结果分析 (见表 2 及表 3)

表 2 正交试验结果

试验次数	乙醇用量/倍	提取时间/h	提取次数	丹酚酸 B
1	6	0.5	1	4.97
2	6	1	2	6.15
3	6	1.5	3	6.08
4	7	0.5	2	6.02
5	7	1	3	6.54
6	7	1.5	1	5.23
7	8	0.5	3	6.48
8	8	1	1	5.25
9	8	1.5	2	6.38
均值 1	5.733	5.823	5.150	
均值 2	5.930	5.980	6.183	
均值 3	6.037	5.897	6.367	
极差	0.304	0.157	1.217	

表 3 方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F	临界值	显著性
1	0.142	2	3.838	19.000	
2	0.037	2	1.000	19.000	
3	2.582	2	69.784	19.000	*
误差	0.04	2			

由实验结果表 2 及方差分析结果表 3 可知,各因素由主到次顺序依次为 C, A, B, 其中提取次数对提取结果有显著影响,其他因素均无显著影响。最佳水平为 $A_2B_2C_3$, 考虑到溶媒用量和提取时间对提取结果无显著性影响,故最终的提取工艺为 $A_1B_1C_3$ 。即 6 倍量 20% 乙醇,提取 3 次,每次 30 min。

2.5.2 总酚酸正交试验结果分析 (见表 4 及表 5)

表 4 正交试验结果

试验次数	乙醇用量/倍	提取时间/h	提取次数	总丹酚酸
1	6	0.5	1	5.93
2	6	1	2	7.69
3	6	1.5	3	8.11
4	7	0.5	2	7.43
5	7	1	3	8.24
6	7	1.5	1	6.84
7	8	0.5	3	7.64
8	8	1	1	6.45
9	8	1.5	2	8.20
均值 1	7.243	7.000	6.407	
均值 2	7.503	7.460	7.773	
均值 3	7.430	7.717	7.997	
极差	0.260	0.717	1.590	

表 5 方差分析表

因素	偏差平方和	自由度	F	临界值	显著性
1	0.108	2	4.500	19.000	
2	0.791	2	32.958	19.000	*
3	4.446	2	185.250	19.000	*
误差	0.02	2			

由实验结果表 4 及方差分析结果表 5 可知,最佳水平为 $A_2B_2C_3$, 各因素的由主到次顺序依次为 C, B, A, 其中提取时间、提取次数对提取结果有显著影响,溶媒用量无显著影响。故最终的提取工艺为 $A_1B_1C_3$ 即 6 倍量 20% 乙醇,提取 3 次,每次 30 min。

2.6 验证试验

准确称取丹参药材 2 份,每份为 50g,分别加 6 倍量 20% 乙醇,提取 3 次,每次 30 min,滤过,滤液合并,精密吸取适量,置 10 mL 量瓶中,加 20% 乙醇至刻度,摇匀,作为供试品溶液备用。

分别按照 2.3、2.4 项下的方法对丹酚酸 B 和总酚酸进行含量测定,结果丹酚酸 B 和总酚酸的含量分别为 6.73%、7.75%。与上述最佳提取工艺经 t 检验,无显著性差异。故丹参总酚酸的最佳提取工艺为 6 倍量 20% 乙醇,提取 3 次,每次 30 min。

3 讨论

丹参为唇形科植物丹参(*Salvia miltiorrhiza*. Bge.) 的干燥根及根茎,具有扩张血管、抗动脉粥样硬化、保护心肌、抗血栓、改善微循环及调节组织修复等功效^[1,3]。丹参为治疗心血管疾病的常用药材,它的化学成分主要分为脂溶性和水溶性两类,水溶性成分主要为酚酸类化合物,该类化合物具有保护心肌、扩张血管、抗动脉粥样硬化、抗肿瘤等多种作用^[3]。作者以总酚酸和丹酚酸 B 为指标,对水、20%、50%、乙醇进行单因素考察,结果,50% 乙醇对丹酚酸 B 提取率最高,其次是 20% 乙醇,20% 乙醇对总酚酸提取率最高,其次是 50% 乙醇,但 20% 和 50% 乙醇对总酚酸和丹酚酸 B 的提取结果无显著性差异。故本实验选用 20% 乙醇。

目前测定总酚酸含量的方法有:三氯化铁-铁氰化钾显色法和 $\text{NaNO} - \text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 络合显色法,采用三氯化铁-铁氰化钾显色法测定总酚酸含量时干扰因素较多,方法专属性差,结果不准确,而 $\text{NaNO} - \text{Al}(\text{NO}_3)_3$ 络合显色法测(下转第 38 页)